Über

Fermentausscheidung von Vibrio Koch.

(Koch'scher Kommabacillus der Cholera asiatica)

und

Vibrio Proteus

(Finker-Prior'scher Kommabacillus der Cholera nostras).

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

in der

Medicin, Chirurgie und Geburtshilfe

der

hohen medicinischen Facultät zu München

unter dem Präsidium des

Herrn Geheimrath Prof. Dr. **v. Ziemssen**

vorgelegt von

Heinrich Bitter,
approb. Arzt aus Unna in Westfalen.

München, 1886.
Druck von R. Oldenbourg.

Über

Fermentausscheidung von Vibrio Koch.

(Koch'scher Kommabacillus der Cholera asiatica)

und

Vibrio Proteus

(Finker-Prior'scher Kommabacillus der Cholera nostras).

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

in der

Medicin, Chirurgie und Geburtshilfe

der

hohen medicinischen Facultät zu München

unter dem Präsidium des

Herrn Geheimrath Prof. Dr. **v. Ziemssen**

vorgelegt von

Heinrich Bitter,
approb. Arzt aus Unna in Westfalen.

München, 1886.
Druck von R. Oldenbourg.

Seinem Grossonkel

Herrn Stadtphysikus Sanitätsrath Dr. Bernay

zu Cöln

in Liebe und Verehrung

gewidmet vom

Verfasser.

Die über die chemischen Wirkungen der Spaltpilze in neuerer Zeit mehrfach angestellten Untersuchungen beziehen sich meist auf jene Producte, die durch gärungsartige Zersetzungen hervorgebracht sind. Eine Reihe von Spaltpilzen aber, zu welcher auch Vibrio Koch. gehört, liefern Ausscheidungen, welche mit Gärungsvorgängen zunächst nichts zu thun haben, vielmehr sich den sogenannten Fermenten oder Contactsubstanzen der höheren Pflanzen und der Thiere durch ihre Wirkungen am meisten annähern. So ist auch die gelatineverflüssigende Eigenschaft des Koch'schen Vibrio, sowie des ihm nahe verwandten Finkler-Prior'schen Vibrio Proteus auf die Wirkung eines derartigen Ausscheidungsproductes zurückzuführen. Nachdem, wie in folgendem gezeigt wird, sich ergeben hatte, dass beide Vibrionen wie bei Gelatine so auch bei coagulirtem Eiweiss eine Verflüssigung herbeiführen, gelang es, den Nachweis zu erbringen, dass diese Verflüssigung nicht unmittelbar mit der Lebensthätigkeit der Vibrionen zusammenhängt, dass dieselbe vielmehr durch ein von den Vibrionen producirtes, ungeformtes, peptonisirendes Ferment vermittelt wird; dies von den Vibrionen isolirte Ferment wurde sodann in chemisch-physiologischer Beziehung weiter untersucht. Ferner werden nachstehend einige Versuche angeführt, welche zu der Annahme führten, dass Vibrio Koch. wie auch Vibrio Proteus ein diastatisches Ferment abspalten. Hieran reihen sich sodann einige Beobachtungen betreffs der Einwirkung des peptonisirenden

Fermentes und der anderen Zersetzungsproducte auf lebende Blutkörperchen.

Zum Schluss wird das Ergebnis einiger Versuche mitgetheilt, durch welche eruirt werden sollte, worauf die Wachsthumsverschiedenheit zwischen Vibrio Koch. und Vibrio Proteus in Platten- und Stichculturen beruht.

I.

Um zunächst festzustellen, ob Vibrio Koch. wie Gelatine, so auch coagulirtes Eiweiss in einen flüssigen Zustand überzuführen, d. h. zu peptonisiren vermöge, wurden in vier trocken sterilisirte Fläschchen je 20 ccm einer Fleischwasserpeptonkochsalzlösung (100 ccm Fleischwasser, 1,0 Pepton, 0,5 Kochsalz) und Eiweisswürfel aus coagulirtem Eiereiweiss von verschiedener Grösse gegeben. Nachdem die wohlverschlossenen Gläser vier Mal 25 Minuten im Dampfcylinder sterilisirt worden, wurden je zwei mit Reinculturen von Vibrio Koch. und Vibrio Proteus inficirt und im Brütkasten bei 37 ° C. aufbewahrt.

In einem mit Vibrio Koch. inficirten Fläschchen befanden sich zwei Eiweisswürfel von verschiedener Grösse. Der eine, dessen Seiten eine Länge von 1½—2 cm hatten, ragte mit seinem obersten Theile aus der Flüssigkeit hervor; der kleinere, 0,5 cm hoch, war ganz von der Nährlösung bedeckt. Die Beobachtung dieser beiden Würfel ergab Folgendes:

Am 1. Tage nach der Infection: Die Nährlösung ist deutlich getrübt; es zeigt sich beginnende Deckenbildung. Der grössere Eiweisswürfel erscheint in seinem oberen Theil etwas angenagt und an den Rändern leicht durchscheinend. An dem kleineren ist noch keine Veränderung wahrnehmbar.

Am 2. Tage. Dichte Trübung; dichte Decke. Der grosse Würfel hat in seinem oberen Theil das Aussehen einer abgestumpften Pyramide; der kleinere beginnt an Ecken und Kanten durchscheinend zu werden.

Am 3. Tage. Der kleine Würfel ist ganz durchscheinend ohne eine Gestaltveränderung aufzuweisen; der grössere ist in seiner oberen Hälfte unregelmässig angenagt und zerfressen, namentlich in der Höhe des Niveaus der Nährlösung ist eine unregelmässig gezackte Einbuchtung. Sein aus der Lösung hervorragender Theil erscheint niederer als früher. Er ist jetzt auch in seiner unteren Hälfte etwas durchscheinend.

Am 4. Tage. Das kleine Eiweissstück ist etwa um die Hälfte seines Volumens gleichmässig verkleinert, ohne seine regelmässige Würfelform ver-

loren zu haben. Der grössere Würfel ist vielfach zerklüftet, völlig durchscheinend und unregelmässig verkleinert. Mit dem Durchscheinendwerden trat bei beiden Würfeln allmählich eine bräunliche Färbung auf. Ferner scheinen dieselben auch specifisch leichter geworden zu sein. Beim Umschütteln des Fläschchens schwammen dieselben in der Flüssigkeit umher und setzten sich erst nach einiger Zeit wieder zu Boden im Gegensatz zu unveränderten Eiweissstücken. Zum Schluss zerfielen beide Würfel in kleine, krümelige Brocken, welche selbst nach längerer Zeit nicht völlig verschwunden sind.

Im allgemeinen erfolgt die Auflösung der Eiweisswürfel durch Vibrio Koch. und Vibrio Proteus in ziemlich gleicher Weise. Zunächst werden die äussersten Schichten, zumal die Kanten und Ecken, durchscheinend; sie erscheinen bald wie abgeschliffen. Weiterhin verfallen die durchscheinenden Partien allmählich der Verflüssigung. Kleinere Eiweissstücke können völlig durchscheinend werden, so dass man das Fensterkreuz deutlich durch sie erkennen kann. Bei grösseren Stücken müssen erst die äusseren Partien abgelöst werden, bevor das Centrum ergriffen wird. Die Einwirkung des in Frage kommenden Fermentes scheint im allgemeinen ziemlich gleichmässig zu erfolgen, wie der kleine Eiweisswürfel durch seine regelmässige Volumensverminderung beweist. Nur dort, wo das Ferment in grösserem Maassstabe producirt wird, d. i. nahe an der Oberfläche der Nährlösung, wo infolge reichlicher Sauerstoffzufuhr die Vibrionen üppig wachsen, ist auch seine Wirkung am energischesten. Die Spaltungen und Zerklüftungen nach längerer Einwirkung scheinen mehr rein mechanischer Natur zu sein und in einem lockeren Zusammenhang innerhalb des Eiweisswürfels selbst zu bestehen.

Um für die oben angeführte Beobachtung, dass die Eiweissstücke durch Einwirkung der Vibrionen specifisch leichter geworden zu sein schienen, den Beweis zu erbringen, wurde coagulirtes Hühnereiereiweiss in der oben angegebenen Weise der Einwirkung der Koch'schen Vibrionen ausgesetzt und geeignete, durchscheinend gewordene Stücke sofort nach der Entnahme aus der Nährlösung sorgfältig abgetrocknet, genau gewogen und sodann getrocknet. Desgleichen wurden Stücke unveränderten, coagullrten Eiereiweisses genau gewogen und getrocknet. Es ergaben sich folgende Zahlen:

1. Ein Eiweissstück, 7 Tage der Einwirkung der Vibrionen ausgesetzt, in den peripheren Schichten durchscheinend, im Centrum aber augenscheinlich noch unverändert, wog: Frisch der Nährlösung entnommen 18,575 g, nach

völliger Austrocknung noch 1,983 g; es bestand demnach aus 89,93 % Wasser und 10,07 % eigentlichem Eiweiss.

2. Ein ganz durchscheinendes Eiweissstück wog nach achttägiger Einwirkung der Vibrionen frisch 15,820 g
trocken 1,270 g,

d. h. es enthielt 91,97 % Wasser und 8,03 % wirkliches Eiweiss.

Nach elftägiger Einwirkung der Vibrionen ergaben völlig durchscheinende Eiweissstücke ein Gewicht

3. frisch von 19,383 g
trocken von 1,688 g,

d. h. 91,30 % Wasser und 8,70 % Eiweiss.

4. frisch von 10,601 g
trocken von 0,955 g,

d. h. 90,99 % Wasser und 9,01 % Eiweiss.

Als Durchschnitt ergibt sich aus diesen vier Versuchen bei den durchscheinenden Eiweissstücken ein Bestand von 8,95 % Eiweiss und 92,05 % Wasser.

Dagegen zeigte unverändertes, coagulirtes Eiereiweiss im Durchschnitt ein Verhältnis von 10,56 % Eiweiss zu 89,54 % Wasser.

Wahrscheinlich wird bei noch längerer Einwirkung der Vibrionen auf Eiweissstücke als hier die Abnahme an festem Eiweiss und die Wasserzunahme noch deutlicher hervortreten.

Es scheint demnach das Eiereiweiss nicht aus einer homogenen Masse zu bestehen, sondern aus Eiweisstheilchen von verschiedener Löslichkeit, welche ziemlich gleichmässig vertheilt sind. Die Einwirkung des Fermentes scheint in der Weise zu erfolgen, dass zuerst die leicht löslichen Theile aufgelöst werden und in die umgebende Flüssigkeit austreten; hierdurch wird das Eiweissstück natürlich ärmer an festem Eiweiss und reicher an Wasser und so specifisch leichter. Erst später nach etwas längerer Einwirkung des Fermentes werden auch die schwerer löslichen Eiweisskörper peptonisirt.

Das Durchscheinendwerden der Eiweisswürfel kann nicht etwa in einer Aufquellung seinen Grund haben; denn die Würfel nehmen keineswegs an Volumen zu. Auch ist die Annahme, dass es sich bei den durchscheinend gewordenen Partien um eine Mittelstufe zwischen Eiweiss und Pepton handle, von der Hand zu weisen. Herr Privatdocent Dr. Löw hatte die Güte zu constatiren, dass die durchscheinenden Eiweissstücke unlöslich sind:

1. in kochendem Wasser, 2. in verdünnter Salzsäure, auch beim Kochen 3. in Lösung von kohlensaurem Natrium, ebenfalls auch beim Kochen. Sie sind also weder dem Syntonin ähnlich, noch dem Propepton. Es muss sich nahezu um unverändertes Eiweiss handeln, vielleicht um eine physikalische Modification des coagulirten Albumins.

Dass die Vibrionen eine derartige Wirkung auf Eiweissstücke nur vermittelst eines von ihnen producirten, ungeformten Fermentes auszuüben im Stande sind, stand von vornherein ausser allem Zweifel. Anfangs wurde beabsichtigt durch mikroskopische Untersuchung der centralen Partien der durchscheinenden Eiweissstücke den Beweis zu liefern, dass im Inneren derselben keine Vibrionen sich vorfänden, dass also das Durchscheinendwerden allein auf der Wirkung des von aussen eindringenden Fermentes beruhe. Allein da sich mittlerweile, wie die folgenden Versuche darthun, herausgestellt hatte, dass man das Ferment auf einfache Weise unabhängig von der Lebensthätigkeit der Vibrionen in seiner Wirkung beobachten kann und dass seine Wirksamkeit eine sehr intensive ist, wurde von diesem Vorhaben als einem überflüssigen abgestanden.

Der Versuch, das Ferment von der Lebensthätigkeit der Mikrobien zu isoliren, gründete sich auf die grosse Empfindlichkeit des Vibrio Koch. gegen Temperaturen, die über 45° C. hinausgehen. Wird er eine halbe Stunde lang einer Temperatur von 60° C. ausgesetzt, so zeigt er keine Lebenserscheinungen mehr, während die Annahme, dass das von ihm gebildete Ferment durch einen derartigen Eingriff noch nicht zerstört würde, von vornherein viel Wahrscheinlichkeit für sich hatte.

Hieraufhin wurden Versuche in folgender Weise angestellt. Eine sterilisirte Fleischwasserpeptonkochsalzlösung (100 ccm Fleischwasser, 1,0 Pepton, 0,5 Kochsalz) wurde mit Vibrio Koch. inficirt und bei 37° C. aufbewahrt. Nach fünftägigem, üppigem Wachsthum wurde aus dieser Nährlösung 1. zur Controle ein Reagensröhrchen mit gleicher Nährlösung inficirt. Sodann wurde die ursprünglich inficirte Nährlösung eine halbe Stunde in einem Wasserbade von 60° C. erwärmt, und 2. von dieser erwärmten Flüssigkeit mittels steriler Drahtschlinge einige Tropfen in ein zweites Controlglas mit Nährlösung übertragen. 3. Endlich wurden in zwei Röhrchen mit je 10 ccm einer sterilen, durch Erwärmen verflüssigten, 10proc. Gelatine je 10 ccm von der mit Vibrio Koch.

inficirten, auf 60° C. erwärmten Nährlösung mittels steriler Pipetten hineingegeben. Zweck dieses letzten Versuches war die Wirkung des mit Wahrscheinlichkeit noch intacten, peptonisirenden Fermentes von Vibrio Koch. nach 24stündiger Einwirkung durch die Erstarrungsfähigkeit der Gelatine zu prüfen. Durch Versuch 2 sollte dargethan werden, dass in der inficirten Nährlösung nach dem Erhitzen kein lebender Vibrio mehr vorhanden war. Versuch 1 soll den Beweis für die volle Lebenskräftigkeit des Vibrio Koch. vor dem Erhitzen erbringen. Nachdem die Röhrchen aller Versuche 24 Stunden im Brütkasten bei 37° C. aufbewahrt sind, ergiebt sich folgendes Resultat:

1. Versuch zeigt ein üppiges Wachsthum. Ein sofort angefertigtes mikroskopisches Präparat lässt eine Reincultur von Vibrionen erkennen.

2. Versuch. Es ist keine Spaltpilzvermehrung eingetreten. Das Röhrchen wird noch mehrere Tage bei 37° C. aufbewahrt, ohne dass sich Vegetationen von Bacterien zeigten, ein Beweis, dass durch das Erwärmen die Lebensthätigkeit bei allen Vibrionen völlig erloschen ist.

3. Versuch. Beide Röhrchen werden eine halbe Stunde lang einer Temperatur von 0° C. in Eiswasser ausgesetzt. Es tritt keine Erstarrung ein, d. h. der Leim in beiden Röhrchen ist vollständig in Leimpepton übergeführt. Um dem Vorwurf zu begegnen, es könne durch eine Verunreinigung ein anderer Spaltpilz diese Peptonisirung bewirkt haben, wird in eine Nährlösung mittels erhitzter Drahtschlinge etwas Flüssigkeit aus den Gelatineröhren gegeben. Nach mehrtägigem Aufbewahren bei 37° C. zeigt sich auch dies Controlglas völlig klar und spaltpilzfrei.

Durch diese Versuche, die vielfach wiederholt wurden, ist unanfechtbar der Beweis erbracht, dass Vibrio Koch. einen Stoff abscheidet, welcher unabhängig von der Lebensthätigkeit des Vibrio selbst eine peptonisirende Wirkung entfaltet, d. h. dass derselbe ein ungeformtes, peptonisirendes Ferment producirt. Es ist also hier zum erstenmale der Nachweis geliefert, dass ein Spaltpilzferment analog den Fermenten der höheren Organismen auch abgetrennt von der erzeugenden Zelle seine chemische Wirksamkeit auszuüben im Stande ist.

Dieses Ferment muss natürlich auch die für ein Ferment charakteristische Eigenschaft besitzen, in geringer Menge allmählich grössere Quantitäten der betreffenden Substanzen entsprechend umzuwandeln, d. h. im vorliegenden Falle grössere Mengen von Leim oder Eiweiss zu peptonisiren.

Folgender Versuch beweist diese Fähigkeit für das oben postulirte Ferment.

Ein Gelatineröhrchen mit 10 ccm einer 8proc. Gelatine wurde mit sechs Tropfen einer durch Erwärmen, wie oben angegeben, hergestellten Fermentlösung beschickt und bei 37° C. aufbewahrt. Die gelatinelösende Wirkung der in sechs Tropfen Fermentflüssigkeit vorhandenen minimalen Menge von Ferment wurde wiederum durch Abkühlen des Röhrchens auf 0° (eine halbe Stunde in Eiswasser) controlirt:

1. Tag. Gelatine ist völlig starr.
2. Tag. „ „ „ „
3. Tag. Bei Erschütterung des Röhrchens erzittert die Oberfläche der Gelatine, ohne dass bei Neigung des Röhrchens eine Veränderung derselben auftritt.
4. Tag. Wie gestern.
5. Tag. Bei Neigung des Röhrchens tritt langsam eine Oberflächenveränderung ein, ein Beweis, dass ein Theil des Leimes nicht mehr gelatinirbar ist.

Hieraus geht also hervor, dass geringe Mengen Ferment mit der Zeit verhältnismässig grosse Mengen Leim zu peptonisiren vermögen.

Weiterhin wurden die Untersuchungen über die Wirkung in Vergleich gebracht mit den Eigenschaften des Pankreatin und Pepsin und es ergab sich, dass das Ferment des Vibrio Koch. mit dem Pankreatin manche Aehnlichkeit hat.

Bei den folgenden Versuchen wurde bei jeder vergleichenden Beobachtung Gelatine von derselben Concentration, und ferner Fermentflüssigkeit verwendet, welche durch Erhitzen ein und derselben Cultur in der oben angegebenen Weise gewonnen war.

a) Wirkung des Fermentes in alkalischer, neutraler und sauerer Lösung. Im Gegensatz zu Pepsin zeigt das in Betracht kommende Ferment ähnlich dem Pankreatin in alkalischer Lösung die intensivste Wirkung, ohne indess in neutraler und schwach sauerer Lösung seine Wirksamkeit völlig einzubüssen.

Drei Röhrchen mit:

a) 10 ccm Gelatine- und Fermentlösung, beide alkalisch,
b) 10 ccm „ „ „ „ neutral,
c) 10 ccm „ „ „ „ sauer,

wurden 24 Stunden im Brütkasten bei 37° C. aufbewahrt. Nachdem sie sodann eine halbe Stunde in Eiswasser auf 0° abgekühlt waren, war Röhrchen

a) noch ganz flüssig;
b) ebenfalls flüssig, aber etwas zähflüssiger als a);
c) halbflüssig.

b) Einfluss verschiedener Temperaturgrade. Wird Pankreatin 24 Stunden lang einer Temperatur von 35° C. ausgesetzt, so erfährt dieses Ferment in seiner Wirksamkeit eine erhebliche Schwächung [1]). Dem gegenüber entfaltet das Ferment von Vibrio Koch. gerade bei dieser Temperatur, wenn es derselben auch mehrere Tage ausgesetzt ist, intensive Wirkung, wie aus den oben angeführten Versuchen hervorgeht. Höhere Temperaturen, 80° C. und 100° C. schwächen und vernichten das Ferment bei längerer Einwirkung.

Versuche:

a) 10 proc. Gelatine und 10 ccm Fermentlösung ½ Stunde auf 60° C. erhitzt,
b) 10 „ „ „ 10 „ „ „ 80 „
c) 10 „ „ „ 10 „ „ „ 100 „
werden 24 Stunden bei 37° C. aufbewahrt.

Sodann auf 0° abgekühlt ist:

a) flüssig,
b) starr,
c) starr.

c) Die Gegenwart gewisser Salze, kohlensaures Natrium, salicylsaures Natrium, beschleunigt wie bei Pankreatin erheblich die auflösende Kraft des Fermentes von Vibrio Koch.

a) 5 ccm Fermentlösung und 10 ccm Gelatine
b) 3 „ „ 10 „ und Zusatz einiger Tropfen einer 50 proc. Sodalösung 24 Stunden bei 37° C. aufbewahrt.

Darauf auf 0° C. abgekühlt ergibt:

a) fast ganz starr (Erschütterung der Glaswand setzt die Gelatineoberfläche in zitternde Bewegung),
b) zähflüssig.

Ferner wurde folgender Versuch mit Natrium salicylicum gemacht:

a) sechs Tropfen Fermentlösung zu 10 ccm Gelatine und Zusatz von 0,5 Natr. salicyl.,
b) sechs Tropfen Fermentlösung zu 10 ccm Gelatine ohne Zusatz.

Beide Röhrchen werden bei 37° C. aufbewahrt. Bei Abkühlung auf 0° C. zeigte sich nach dem 1. Tage bei Versuch a) eine zitternde Bewegung der Gelatine bei Erschütterung des Röhrchens, während bei Versuch b) die Gelatine völlig starr war. Erst am dritten Tage zeigte dieses die Erscheinung von Versuch a) am ersten Tage, zu einer Zeit also, wo bei Versuch a) die Gelatine flüssig war.

---

1) Heidenhain, Archiv f. d. g. Physiologie Bd. 10.

Selbstverständlich wurde bei diesen Versuchen mit allen Cautelen, sterilisirten Instrumenten etc. gearbeitet. Stets wurde nach Beendigung des Versuches durch mikroskopische Präparate und Controlimpfung der Beweis geliefert, dass in den Versuchsröhrchen keine Bacterienvegetation sich eingestellt hatte.

II.

Mit der Production eines peptonisirenden Fermentes ist die fermentative Thätigkeit des Koch'schen Vibrio noch nicht erschöpft. Wie aus den folgenden Versuchen geschlossen werden muss, ist er auch Erzeuger eines diastatischen Fermentes.

Wenn dem Koch'schen Vibrio nur Eiweisskörper und Salze als Nährmaterial zu Gebote stehen, so nimmt die Reaction der Nährlösung infolge von Abscheidung von Ammoniak eher noch an Alkalescenz zu. Bei Gegenwart von Rohr-, Frucht- und Traubenzucker aber beobachtet man, dass der Koch'sche Kommabacillus diesen unter Säurebildung zerlegt, so dass die Reaction der Nährflüssigkeit allmählich an Alkalescenz verliert und schliesslich schwach sauer wird.

Dieselbe Aenderung der Reaction tritt nun ein, wenn anstatt des Traubenzuckers in der Nährlösung Stärkekleister vorhanden ist.

In drei sterile Fläschchen von gleicher Grösse wurden gegeben:

in das 1. 20 ccm einer deutlich alkalischen Fleischextractpeptonlösung Fleischextract 0,5, Pepton 1,0, destill. Wasser 100);

in das 2. 20 ccm der bezeichneten Lösung und 0,2 g Weizenstärke;

in das 3. wie bei Fläschchen 2.

Nachdem sodann alle drei Fläschchen zusammen durch viermaliges Erhitzen im Dampfcylinder sterilisirt waren, wobei zugleich in Versuch 2 und 3 eine Verkleisterung der Stärke eintreten musste, werden Fläschchen 1 und 2 mit Vibrio Koch. inficirt und zusammen mit dem sterilen Fläschchen 3 bei 37° C. aufbewahrt.

Nach fünftägigem Verweilen im Brütkasten zeigt sich

in Versuch 1 üppige Vermehrung der Vibrionen, dichte Deckenbildung;

in Versuch 2 sparsame Vermehrung, keine Deckenbildung;

in Versuch 3 keine Bacterienvegetation.

Die Reaction war bei:

1. deutlich alkalisch,
2. schwach sauer,
3. deutlich alkalisch.

Die Versuche 1 und 3 waren Controlversuche, durch deren negativen Ausfall bezüglich der Reactionsveränderung das positive Ergebnis des Versuches 2 die Beweiskraft erhält, dass der Koch'sche Vibrio aus Stärke Säure zu bilden vermag. Die schliesslich von ihm herbeigeführte sauere Reaction in der Nährlösung ist seinem Wachsthum ungünstig, wie aus der mangelhaften Vermehrung bei Versuch 2 hervorgeht.

Der Finkler'sche Vibrio Proteus zeigt in dieser Beziehung ein dem Vibrio Koch analoges Verhalten, wie folgende Versuche in sehr augenfälliger Weise darthun.

Zwei sterile Fläschchen mit 20 ccm Fleischwasserpeptonkochsalzlösung versehen werden durch Zusatz alkalischer Lackmustinktur deutlich gebläut und sodann nach gehöriger Sterilisation das eine mit Vibrio Koch, das andere mit Vibrio Proteus inficirt. Am folgenden Tage zeigen die Nährlösungen eine rothe Farbe. Plattenculturen und mikroskopische Untersuchung lassen Reinculturen von Vibrio Koch. und Vibrio Proteus erkennen.

Die Säurebildung aus Stärke hat nun zwar zur nothwendigen Voraussetzung, dass das Amylon zunächst in eine lösliche Form übergeführt und so diosmirbar gemacht wird, d. h. dass sich eine Zuckerart ausserhalb des Bacterienkörpers durch indirecten Einfluss der Vibrionen aus Amylon bildet, welche weiterhin von den Vibrionen unter Säurebildung zerlegt wird. Dies aber führt zu der Annahme der Production eines diastatischen Fermentes als eines nothwendigen Postulates.

Der Versuch Traubenzucker in einer mit Kleister versetzten, sterilisirten und sodann mit Vibrio Koch. inficirten Nährlösung nachzuweisen misslang. Allein dies war nicht besonders auffallend. Denn da die Traubenzuckerbildung nur ganz allmählich vor sich gehen konnte, so war von vornherein anzunehmen, dass der Traubenzucker kurz nach seinem Auftreten durch die Lebensthätigkeit der Vibrionen eine weitere Zerlegung erführe.

Das Augenmerk war nun darauf gerichtet auch dies Ferment isolirt von den Vibrionen auf seine Wirksamkeit zu prüfen.

Auch hier wurde zunächst in einer Nährlösung nach mehrtägigem, üppigem Wachsthum von Vibrio Koch. durch Erwärmen (½ Stunde lang bei 60 °C.) die Lebensthätigkeit sämmtlicher Vibrionen vernichtet und die so gewonnene Flüssigkeit zu Versuchen verwandt.

Es gelang nicht, auch nach längerer Einwirkung auf Stärkekleister eine diastatische Fermentwirkung dieser Flüssig-

keit durch den Nachweis von Zucker mittels Fehling'scher Lösung zu constatiren.

Von der Erwägung ausgehend, dass die Temperatur von 60 ° C. bei längerer Einwirkung dieses Ferment zerstören könnte — Ptyalin einer Temperatur von 55 ° C. ausgesetzt, wird in seiner Wirksamkeit erheblich geschwächt — wurde ein anderer Weg eingeschlagen, bei Ausschluss der Lebensthätigkeit der Vibrionen die Zuckerbildung des von ihnen gebildeten Fermentes aus Stärke zu beobachten.

Die Thatsache, dass der Vibrio Koch. ein exquisit aërober Spaltpilz ist und dass bei Sauerstoffmangel sein Wachsthum sofort still steht, diente folgendem Versuch zur Grundlage.

Ein steriler Glaskolben, 300 ccm fassend, an dessen nach abwärts umgebogenem Hals mittels Kautschukschlauch ein Ansatzröhrchen luftdicht angeschlossen war, wurde mit 100 ccm 1 proc. Weizenstärkekleister beschickt und nach Verschluss mit Baumwollpfropfen in gehöriger Weise sterilisirt. Sodann wurde der Inhalt im Sandbad bis auf die Hälfte eingedampft, wobei der aufsteigende Wasserdampf alle atmosphärische Luft aus dem Kolben vertreiben musste, und hierauf mit Klemmschraube der Kautschukschlauch luftdicht abgeschlossen. Nachdem nun durch Abkühlung des Glaskolbens in seinem Inneren ein bedeutender negativer Druck sich gebildet hatte, wurde das vorher in der Flamme sterilisirte Ansatzröhrchen in ein Glas getaucht, welches ca. 350 ccm einer Fleischwasserpeptonkochsalzlösung mit einer fünf Tage alten Vegetation üppig wachsender Vibrionen enthielt. Bei langsamem Aufschrauben der Klemmschraube füllte sich der Glaskolben rasch mit der bacterienhaltigen Flüssigkeit; hierauf wurde wieder luftdicht abgesperrt.

Nach achttägigem Aufbewahren bei 37 ° C. wurde der Inhalt dieses Kolbens im Wasserbad eingedampft; sodann ein aus dem Rückstand gewonnener weingeistiger Auszug nochmals eingedampft und der Rückstand mit destillirtem Wasser aufgenommen. Bei Untersuchung mit Fehling'scher Lösung zeigte sich auch hier keine Kupferoxydulausscheidung.

Da nun möglicherweise das in Frage stehende Ferment nur bei Gegenwart von Sauerstoff eine Wirkung entfaltet und an dem negativen Ausfall dieses Versuches der Abschluss des Sauerstoffes Schuld ist, so wurde bei einem dritten Versuchsmodus zur Unterdrückung der Lebensthätigkeit der Vibrionen eine antiseptische Lösung in Anwendung gebracht, und zwar wurde Dijodacetamid verwendet, welches entsprechend seinem Jodgehalt in einer Concentration von 1,2 ‰ das Wachsthum von Bacterien verhindert. Auch hier wurden ca. 300 ccm einer Fleischwasserpeptonkochsalzlösung nach mehrtägigem, üppigem Wachsthum von Vibrio Koch.

mit Stärkekleister unter Zusatz von Dijodacetamid zusammengebracht und bei 37 ° C. aufbewahrt. Nach acht Tagen wurde wie beim vorhergehenden Versuch verfahren ohne auch hier das gewünschte Resultat zu erzielen.

Trotz des negativen Ausfalles aller dieser Versuche muss doch an der Production eines diastatischen Fermentes von Seiten des Vibrio Koch. festgehalten werden. Es handelt sich entweder um ein sehr empfindliches Ferment, dessen Wirkung durch dieselben Eingriffe, welche die Lebensthätigkeit der Vibrionen lähmten, aufgehoben wurde, oder aber das Ferment wird kurz nach seiner Abscheidung aus dem Bacterienkörper chemisch verändert oder vielleicht von den Vibrionen selbst weiter zersetzt, so dass wenigstens auf den oben eingeschlagenen Wegen die Isolirung einer hinreichenden Menge Fermentes von den lebenden Vibrionen nicht erreicht werden konnte.

Dass indess die Bildung eines diastatischen Fermentes eine ziemlich erhebliche ist, zeigt folgender Versuch.

Es wurden mehrere Fläschchen mit 50 ccm und 100 ccm Fleischwasserpeptonkochsalzlösung und 1 % Stärkegehalt sterilisirt, wodurch die Stärke verkleistert wurde, und dann mit Vibrio Koch inficirt bei 37 ° C. aufbewahrt. Sobald die Reaction neutral oder gar schwach sauer wurde, wurde vorsichtig durch tropfenweises Zusetzen einer sterilen Normal-Natronlauge mit steriler Pipette die schwach alkalische Reaction wieder hergestellt. Innerhalb 14 Tagen waren nun 70—90 Tropfen = 5—6 ccm der Natronlauge zur Herstellung der ursprünglichen Reaction nothwendig. Die Stärke nahm sichtlich ab, bei den Gläsern mit 100 ccm Inhalt mindestens um die Hälfte. Dass sie schliesslich nicht völlig verschwand, mag vielleicht darauf beruhen, dass die Vibrionen nach 14tägigem Wachsthum in der zum Theil verbrauchten mit Zersetzungsproducten geschwängerten Nährlösung nicht mehr die zur Bildung des Fermentes genügend kräftige Wachsthumsenergie haben konnten.

III.

Bei der hochgradigen Wirkung des oben nachgewiesenen peptonisirenden Fermentes von Vibrio Koch. erschien es von Bedeutung, dieses Ferment direct auf das Eiweiss der lebenden Zelle wirken zu lassen, um zu prüfen, ob dieses Ferment durch eine gleich energische Wirkung auf das Protoplasma lebender Zellen z. B. das Stroma der rothen Blutkörperchen ein Absterben derselben herbeiführe.

In Anwendung kam die von Ehrlich angegebene Methode zum Studium von Blutkörperchengiften (Charité-Annalen Bd. X).

Aus einer Ohrvene eines Kaninchens, deren Umgebung zuerst mit weingeistiger, dann mit wässeriger Sublimatlösung, dann mit sterilem Wasser abgewaschen und hierauf mit sterilisirtem Papier sorgfältig abgetrocknet war, wurde durch Einschnitt mit ausgeglühtem Messer Blut entnommen, das tropfenweise in untergehaltene, sterile Reagensgläser fiel. Diese Reagensgläser enthielten je 10 ccm der von Ehrlich angegebenen Salzlösung (500 ccm Wasser, 1,3 Dinatriumphosphat, 1,0 Traubenzucker, 3,0 Kochsalz) und waren mit einer Glasperle versehen. Durch Umschütteln sofort nach dem Hineintropfen des Blutes wurde das Fibrin in feinen Flocken ausgeschieden und so ein Eingeschlossenwerden der Blutkörperchen in grösseren Gerinnseln vermieden. Ehrlich hat gezeigt, dass sich die Blutkörperchen auf diese Weise bei Körpertemperatur mindestens eine Woche gut conserviren lassen. Das Absterben derselben kennzeichnet sich durch Trennung des Hämoglobins vom Stroma; hierbei löst sich das Hämoglobin in der Salzlösung und diese wird dadurch roth gefärbt. Solange die Blutkörperchen nicht abgestorben sind, liegen sie am Boden des Reagensglases; die darüber befindliche Salzlösung ist völlig farblos.

Die so hergestellten Blutproben wurden bei 37° C. aufbewahrt.

Zu den folgenden Untersuchungen wurde wiederum eine Nährlösung verwandt, welche nach fünftägigem Wachsthum des Koch'schen Vibrio eine halbe Stunde bei 60° C. erwärmt war. Nachdem sich zunächst ergeben hatte, dass tropfenweises Zusetzen dieser Flüssigkeit keinen merklich schädigenden Einfluss auf die Blutkörperchen ausübe, wurden am 4. Tage nach Herstellung der Blutproben je zwei derselben mit 2, 4, 7, 10 ccm der Fermentlösung versetzt und diese Proben nach Umschütteln mit mehreren Controlgläsern weiter bei 37° C. aufbewahrt. Es ergab sich folgendes:

Tag	Controlglas	Probe mit Fermentlösung und zwar mit			
		2 ccm	4 ccm	7 ccm	10 ccm
5.	Salzlösung farblos	Salzlösung farblos			völlige Lösung
6.	Salzlösung farblos	Salzlösung farblos		Beginn der Lösung	
7.	Salzlösung farblos	Salzlösung farblos	Beginn der Lösung	Beendigung der Lösung	
8.	Salzlösung farblos	Salzlösung farblos	Beendigung der Lösung		
9.	deutlicher Beginn der Lösung	Salzlösung farblos			
10.	Lösung beendet	Lösung hat begonnen			
11.		Lösung noch nicht ganz beendet			

Beginn der Lösung wurde bei Gelbwerden der Salzlösung notirt. Bei völliger Lösung ergab die mikroskopische Untersuchung das Verschwundensein aller Blutkörperchen.

Zunächst ist hei diesem Ergebnis auffallend, dass geringere Mengen der angewandten Fermentflüssigkeit nicht nur keinen schädigenden Einfluss auf die Blutkörperchen entwickeln, sondern im Gegentheil eher eine conservirende Wirkung zu haben scheinen. Auch aus der mikroskopischen Untersuchung der Blutscheiben im Controlglas und einem Röhrchen mit Zusatz von 2 ccm der Fermentflüssigkeit scheint dies hervorzugehen. Denn am 6. Tage nach Herstellung der Blutproben zeigten die Blutscheiben im Controlglas hochgradigere Veränderungen als in dem mit 2 ccm Fermentflüssigkeit versetzten Röhrchen. Während in letzterer Probe die überwiegende Mehrzahl der Blutscheiben Stechapfelformen aufwies mit mannigfachen Uebergängen zu den glattrandigen Formen und die Grösse ziemlich bei allen die eines normalen Blutkörperchens war, zeigten sich in dem Controlglas nur noch wenige Stechapfelformen; es waren bereits viele Kugelformen aufgetreten, von kleinerem und auch weniger regelmässigem Umfang, zum Theil zu grösseren Kugeln zusammengeflossen.

Diese eher conservirende Eigenschaft geringerer Mengen der in Anwendung gebrachten Fermentflüssigkeit ist wohl ihrem Peptongehalt zuzuschreiben, welcher ähnlich dem Traubenzucker in der Salzlösung ernährend wirken dürfte.

Auf jeden Fall aber hat sich gezeigt, dass das lebende Discoplasma der Blutscheiben der Wirkung von Fermentmengen gegenüber, welche auf Gelatine bereits einen erheblichen, peptonisirenden Einfluss erkennen lassen (vgl. oben) einen kräftigen Widerstand leistet.

Bei den weiteren Versuchen mit 4, 7, 10 ccm Fermentlösung ist die Beschleunigung der Auflösung wohl nicht allein auf die grössere Fermentmenge zu beziehen. Sicherlich kommen auch die übrigen, zum Theil so widerlich riechenden Zersetzungsproducte des Vibrio Koch., wenn nicht gar in erster Linie, in Betracht.

Bekanntlich wurde aus dem Umstande, dass in Plattenculturen des Koch'schen Vibrio bei Gegenwart rother Blutkörperchen ein Verschwinden derselben in der Umgebung

der Colonien, und zwar weit über die verflüssigte Zone hinaus, beobachtet wird, der Schluss gezogen, dass von dem Vibrio Koch. ein ganz besonderes, sehr intensiv wirkendes Gift abgesondert würde, welches in weitem Umfange die Blutzellen tödte. Nach dem Ergebnis der oben angeführten Versuche nun wurde die Annahme eines so intensiven Giftes zweifelhaft. Denn es war nicht einzusehen, warum bei Gegenwart merklicher Mengen eines solchen, wie sie doch in 2 ccm der in Anwendung gebrachten Flüssigkeit vorhanden sein mussten, selbst bei mehrtägiger Einwirkung absolut kein schädigender Einfluss auf die Blutkörperchen statthaben konnte. Dagegen erschien es fraglich, ob nicht das mehrtägige Eingeschlossensein in starrer Gelatine, wie es bei Plattenculturen vorkommt, auf so zart organisirte Gebilde schädigend wirke und ob nicht die in dieser Weise bereits erheblich geschwächten Blutscheiben leichter dem Einfluss des jetzt in sie eindringenden Fermentes und anderer Zersetzungsproducte erlägen.

Um dieses zu entscheiden, wurden folgende Versuche angestellt:

Es wurden vier Röhrchen, mit steriler, in der Wärme verflüssigter Fleischwasserpeptongelatine mit je drei Tropfen in oben angegebener Weise gewonnenen defibrinirten Blutes versetzt und bei Zimmertemperatur, also in starrem Zustande, aufbewahrt. Sodann wurden zu dreien derselben und zu zwei Controlblutproben der bekannten Salzlösung je 4 ccm einer frisch hergestellten Fermentflüssigkeit gegeben, und das Ganze wurde bei 37° C., d. i. bei flüssiger Gelatine, aufbewahrt. Das vierte Gelatineröhrchen mit Blut wurde vier Tage lang starr erhalten und am fünften ebenfalls mit 4 ccm Fermentlöung versetzt und in den Brütkasten von 37° C. gebracht. Es ergab sich Folgendes:

8. März		9. März	14. März
1. Zusatz von 3 Tropfen Blut zur Salzlösung	1 Tag bei Zimmertemperatur aufbewahrt	Zusatz von 4 ccm Fermentlösung u. Aufbewahren bei 37° C.	beginnende Lösung
2. Zusatz von 3 Tropfen Blut zum Gelatineröhchren	do.	do.	do.
3. do.	do.	do.	do.
4. do.	do.	do.	do.
5. do.	4 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt	13. März, Zusatz von 4 ccm Fermentlösung und Aufbewahren bei 37° C.	Lösung fast völlig beendet

Bei eintägigem Eingeschlossensein in starrer Gelatine also wird die Lebensthätigkeit der Blutkörperchen nicht wesentlich

beeinträchtigt, wie ein Vergleich der Versuche 2, 3, 4 mit dem Controlversuch 1 ergibt. Dagegen zeigt sich nach viertägigem Verweilen in starrer Gelatine, dass die Blutscheiben innerhalb 24 Stunden bereits durch dieselbe Menge von Ferment fast völlig aufgelöst werden, welche bei den übrigen Versuchen selbst nach viertägiger Einwirkung kaum den Beginn der Lösung erkennen lässt. Längeres Verweilen in starrer Gelatine ist also von erheblich schädlicher Wirkung für die Blutscheiben und zur Erklärung der oben angeführten Erscheinungen bei Plattenculturen erscheint die Annahme eines von den Vibrionen producirten, besonders heftig wirkenden Giftstoffes nicht nothwendig. Die durch längeres Verweilen in der starren Gelatine in hohem Grade angegriffenen Blutscheiben gehen in der von den Vibrionen verflüssigten Gelatine rasch zu Grunde und auch weiterhin, soweit das in die Gelatine diffundirende Ferment diese bereits in einen halbflüssigen Zustand versetzt hat und so den Austritt des Hämoglobins aus den Blutscheiben ermöglicht, verfallen diese unter dem Einfluss des Fermentes und anderer Producte der Vibrionen der Auflösung.

Es lag schliesslich nahe, im Vergleich zu den Blutversuchen mit Vibrio Koch. die Stoffwechselproducte anderer pathogener Bacterien in ihrer Wirksamkeit auf die Blutkörperchen zu untersuchen und zwar wurde der ebenfalls ein peptonisirendes Ferment abscheidende Bacillus anthracis und der Typhusbacillus genommen, bei welch' letzterem Brieger vor kurzem die Production eines giftigen Ptomains nachgewiesen hat.

Eine Nährlösung mit einer Reincultur von Typhusbacillen wurde nach sechstägigem Wachsthum bei 37 ° C. ¾ Stunden lang auf 80 ° C. und eine Milzbrandbacillen-Reincultur in Nährlösung eine Stunde auf 90 ° C. erwärmt und die so gewonnenen Flüssigkeiten zu Versuchen verwandt, nachdem durch Controlimpfung der Beweis des Abgestorbenseins der Bacillen erbracht war.

Auch hier war bei Zusatz von 2 ccm der betreffenden Flüssigkeiten kein schädlicher Einfluss zu constatiren, vielmehr schien sich auch hier die Auflösung der Blutkörperchen im Vergleich zu den Controlgläsern zu verzögern. Dies Verhalten ist namentlich bei dem Typhusbacillus interessant, bei dem Brieger die

Production eines giftigen, chemisch noch nicht genauer charakterisirten Ptomains nachgewiesen hat. Dass nicht etwa das längere Erwärmen auf 80 ° C. den in Frage kommenden Giftstoff zerstört hat, geht schon daraus hervor, dass Brieger selbst bei der Darstellung seines Ptomains bis zur Siedehitze erwärmt und wieder eingedampft hat.

Hiernach dürfte der Schluss nicht ungerechtfertigt sein, dass der vom Typhusbacillus producirte Giftstoff kein Blutgift, sondern ähnlich dem Strychnin, welches nach Ehrlich's Beobachtung auf die Blutkörperchen keinen nachtheiligen Einfluss äussert, eher ein Nervengift ist. In der That lassen sich auch die von Brieger beobachteten Symptome bei Meerschweinchen nach Vergiftung mit dem von ihm hergestellten Ptomain: Speichelfluss, Frequentwerden der Athmung, Parese der Rumpf- und Extremitäten-Muskeln, Erweiterung der Pupille, Diarrhöen, allein durch Affection des Nervensystems erklären.

Anders gestaltet sich natürlich die Sache, wenn die Blutproben mit lebenden Bacterien inficirt werden. Es wurde beobachtet, dass bei Infection mit Vibrio Koch. und dem Typhusbacillus innerhalb einiger Tage alle Blutkörperchen sich mit blaurother Farbe auflösen; es schien Vibrio Koch. eine etwas raschere Auflösung zu bewirken als der Typhusbacillus. Die lebhaften chemischen Processe innerhalb einer solchen inficirten Blutprobe sind natürlich für die Blutkörperchen nicht gleichgültig. Vielleicht ist es hauptsächlich die Entziehung des Sauerstoffes, welche die Blutkörperchen der schnellen Auflösung entgegenführt, worauf die blau-rothe Färbung hinzuweisen scheint. Es wäre interessant, die Wirkung anaërober Spaltpilze im Vergleich zu jener der sauerstoffbedürftigen Mikroben auf die Blutscheiben zu untersuchen.

IV.

Die oben angeführten Versuche in Betreff der fermentativen Wirksamkeit von Vibrio Koch. und Vibrio Proteus ergaben bei beiden ein analoges Verhalten. Ihre peptonisirende Wirkung auf coagulirtes Eiweiss erfolgt in ziemlich gleicher Weise; auch muss bei beiden die Production eines diastatischen Fermentes

angenommen werden. Da nun bei der grossen Aehnlichkeit auch in ihrem sonstigen biologischen Verhalten doch constante Abweichungen in der Wachsthumsart vorhanden sind, so schien es von Interesse, gerade diesen Verschiedenheiten die Aufmerksamkeit zuzuwenden.

Wie bekannt, wird als charakteristisch für das Wachsthum des Vibrio Koch. im Gegensatz zu dem Finkler-Prior'schen Vibrio in Stichcultur angegeben, dass Vibrio Koch. etwa nach zwei Tagen an der Oberfläche eine Luftblase bildet, welche entsprechend der langsamen Verflüssigung der Gelatine bei geringer Breitenausdehnung mehr in die Tiefe geht, während bei Vibrio Proteus bestenfalls am ersten Tage eine Luftblase sich zeigt, welche bald verschwindet, sobald die Verflüssigung über die ganze Breite der Gelatine-Oberfläche bis zur Glaswand fortgeschritten ist. Ausserdem erfolgt bei Vibrio Proteus die Verflüssigung der Gelatine spätestens am zweiten Tage bereits in der ganzen Länge des Impfstiches, bei Vibrio Koch. dagegen bildet sich erst nach mehreren Tagen um den Stichkanal eine schmale, verflüssigte Zone.

So sind die Verhältnisse bei Zimmertemperatur und deutlicher Alkalescenz der Nährgelatine.

Bewahrt man nun eine alkalische Impfstichcultur von Vibrio Koch. bei einer Temperatur von 24° C., welche seinem Wachsthum günstiger ist, so zeigt diese genau das charakteristische Wachsthum des Vibrio Proteus bei Zimmertemperatur. Die Luftblase ist am zweiten Tage bereits verschwunden; die Verflüssigung hat an der Oberfläche die Glaswand erreicht und beginnt bereits in der ganzen Länge des Impfstiches.

Dagegen zeigt eine Stichcultur von Vibrio Koch. in neutraler Nährgelatine bei 24° C. aufbewahrt dasselbe Verhalten wie Vibrio Koch. in alkalischer Nährgelatine bei Zimmertemperatur.

Abgesehen davon, dass dies Verhalten von Vibrio Koch. insofern interessant war, als es schlagend illustrirt, wie unter etwas veränderten Existenzbedingungen ein Spaltpilz in seinen Wachsthumserscheinungen einem anderen, von ihm bei gleichen Ernährungsverhältnissen deutlich zu differenzirenden Bacterium täuschend ähnlich wird, schien es mir gegen eine von Alexander

Pöhl vor kurzem geäusserte Auffassung[1]) bezüglich des wesentlichen biologisch-chemischen Unterschiedes zwischen den Kommabacillen von Koch und denen von Finkler und Prior zu sprechen. Pöhl glaubt aus der Thatsache, dass bei Stichculturen die Entwickelung der Kommabacillen von Koch nur an der Oberfläche, d. h. bei reichlichem Sauerstoffzutritt in lebhafter Weise vor sich geht, die Finkler-Prior'schen Vibrionen dagegen in der ganzen Länge des Stichkanals sich gleichmässig entwickeln, dass ferner bei der schnellen Verflüssigung der Finkler'schen Stichculturen trotz des durch die auftretende Flüssigkeit stattfindenden Abschlusses des Sauerstoffes der Luft eine rapide Entwickelung der Mikrobien stattfinde, den berechtigten Schluss ziehen zu dürfen, dass die Finkler'schen Vibrionen nicht das Sauerstoffbedürfnis der Koch'schen Kommabacillen besitzen. Mit dieser Ansicht ist das oben beschriebene Wachsthum der Koch'schen Vibrionen bei 24 ° C. in alkalischer Nährgelatine nicht in Einklang zu bringen. Man würde zu der unhaltbaren Annahme gedrängt, dass bei höherer Temperatur der Vibrio Koch. nicht mehr ein so ausgesprochenes Sauerstoffbedürfnis habe als bei Zimmertemperatur. Durch folgenden Versuch wurde eine Thatsache gefunden, welche mir zur Erklärung des verschiedenen Wachsthums der in Frage stehenden Mikrobien in Platten- und Stichcultur hinreichend zu sein scheint.

Es wurde je ein Röhrchen 8 proc. Fleischwasserpeptongelatine mit Vibrio Koch. und Vibrio Proteus inficirt und im Brütkasten bei 37 ° C., also mit flüssiger Gelatine, aufbewahrt. Das Wachsthum der Mikrobien wurde beobachtet

nach 15 Stunden:

Vibrio Koch.	Vibrio Proteus.
Es sind sehr kleine und sehr zahlreiche Flöckchen in der Gelatine vertheilt. An der Oberfläche ca. 2 mm stärkere Anhäufung derselben: Bodensatz.	Es zeigt sich gleichmässige Trübung. An der Oberfläche tritt in einer Ausdehnung von 3 mm die Trübung stärker hervor. Beginnende Hautbildung. Unterste Sehicht ist ganz klar.

1) Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. 19. Jahrgang Nr. 8 S. 1159.

Nach 41 Stunden.

Vibrio Koch.	Vibrio Proteus.
Flöckchen wie Tags vorher vertheilt. Die Anhäufung an der Oberfläche hat etwas zugenommen und eine Höhe von 3 mm. Bodensatz hat sich bedeutend vermehrt.	Trübung etwas stärker als Tags vorher. Die stark trübe Schicht an der Oberfläche hat eine Ausdehnung von ca. 5 mm. Es ist kein Bodensatz vorhanden. Die unterste Schicht ist ganz klar.

Unter diesen Umständen zeigt sich also der auffallende Unterschied, dass Vibrio Proteus in höherem Maasse die Tendenz besitzt, an der Oberfläche sich zu halten, während Vibrio Koch schon nach kurzer Zeit des Wachsthums zu Boden sinkt. Als Grund für dieses verschiedene Verhalten ergab sich bei frischer, mikroskopischer Untersuchung eine Differenz in der Eigenbewegung beider Mikrobien. Aus beiden Röhrchen wurde das Material für die Präparate den oberflächlichsten Schichten entnommen. In dem mikroskopischen Bilde zeigte nur ein relativ geringer Bruchtheil der Koch'schen Vibrionen Eigenbewegung, während in dem Präparat von Vibrio Proteus bei fast allen Individuen Eigenbewegung von grosser Lebhaftigkeit sichtbar war. Auf diesem verschiedenen Verhalten scheint mir die Differenz in dem Wachsthum beider Vibrionen in Platten- und Stichcultur hauptsächlich zu beruhen.

Vibrio Proteus, mit grosser Fähigkeit der Eigenbewegung begabt, vermag sich innerhalb der von ihm verflüssigten Zone der Gelatine frei zu bewegen. Selbstverständlich nimmt er seinen Aufenthalt hauptsächlich dort, wo die Ernährungsverhältnisse für ihn am günstigsten sind. Dies ist zunächst die oberflächlichste Schicht der verflüssigten Gelatine, wo er den für seine Vegetation nothwendigen Sauerstoff in reichem Maasse vorfindet; ferner sind es die peripherstен Partien der flüssigen Gelatine; denn dort trifft er noch am meisten unzersetztes Nährmaterial an und sind auch seine Stoffwechselproducte, welche auf seine Entwickelung hemmend einwirken, nicht in dem Maasse angesammelt wie in den mehr central gelegenen Theilen. Auch können die in der sauerstoffarmen Tiefe des Stichkanals befindlichen Vibrionen leicht an die Oberfläche gelangen und von dort mit Sauerstoff gesättigt in die Tiefe zurückkehren. Durch diesen höheren Grad der Eigen-

bewegung wird er also einestheils befähigt sich besser zu ernähren und rascher zu vermehren und auch dem entsprechend mehr Ferment abzuscheiden als der in dieser Beziehung ihm nachstehende verwandte Vibrio Koch., andererseits ist er auch infolge seines Aufenthaltes in den peripherstен und oberflächlichsten Partien im Stande, sein Ferment auf die noch nicht verflüssigte Gelatine mehr direct wirken zu lassen und dadurch auch schneller Verflüssigung zu erzielen.

Dies auf eine Stichcultur übertragen erklärt, weshalb bei Vibrio Proteus die rasch eintretende Verflüssigung der Gelatine sich bald über die gesammte Oberfläche ausdehnt und auch in der ganzen Länge des Stichkanals ebenfalls sich rasch verbreitert, wogegen der mit relativ mangelhafter Eigenbewegung begabte Vibrio Koch. sich zu Boden senkt, deshalb mehr in die Tiefe als in die Breite geht und aus den oben angeführten Gründen überhaupt langsameres Wachsthum und weniger schnelle Verflüssigung zeigt. Das Auftreten der als charakteristisch angegebenen Luftblase bei Vibrio Koch. nach zwei- bis dreitägigem Wachsthum rührt daher, dass die Verdunstung des Wassers der verflüssigten Gelatine fast Schritt hält mit der verhältnismässig langsamen Verflüssigung derselben; bei Vibrio Proteus dagegen übertrifft die Verflüssigung weit die Verdunstung. So kann sich bei ersterem durch die Verdunstung des Wassers der langsam trichterförmig verflüssigten Gelatine ein Hohlraum bilden, welcher bei durchfallendem Licht gesehen wie eine Luftblase erscheint. Bei Vibrio Proteus aber, welcher in kurzer Zeit die ganze Oberfläche verflüssigt hat, kann sich eine derartige Luftblase nicht bilden, da jetzt die Verdunstung gleichmässig von der ganzen Oberfläche erfolgt. Beobachtet man zwei Gelatineröhrchen mit Impfstichen von Vibrio Proteus und Vibrio Koch., welche von gleichem Caliber und deren Gelatineoberflächen gleich weit von ihren Böden entfernt sind, einige Tage nach der Infection, wenn sich in dem mit Vibrio Koch. inficirten Glase die Luftblase ausgebildet hat, so bemerkt man, dass das Niveau der verflüssigten Gelatine bei Vibrio Proteus gesunken ist und sich ungefähr in gleicher Höhe befindet mit dem untersten Theil der Luftblase des Vibrio Koch.

Zur völligen Aufklärung der Verhältnisse muss hier noch die Bemerkung eingeschaltet werden, dass selbstverständlich verflüssigte Gelatine weit rascher ihr Wasser durch Verdunstung verliert als nicht verflüssigte, weil bei letzterer die Anziehung des Leims zu den Wassermolekülen der Verdunstung hinderlich wirkt.

In dem zuerst angeführten Versuche, wo Vibrio Koch. bei 24 ° C. in alkalischer Nährgelatine das Wachsthum des Vibrio Proteus in Stichcultur zeigt, während er in der neutralen Gelatine bei 24 ° C. sich wie Vibrio Koch. in alkalischer Nährgelatine bei Zimmertemperatur verhält, ist das Verhalten offenbar darin begründet, dass Vibrio Koch. bei höherer Temperatur eine gesteigerte Lebensenergie und damit auch grössere Eigenbewegung besitzt, wodurch er den Eigenschaften des Vibrio Proteus bei Zimmertemperatur näher tritt, während die neutrale Nährlösung, welche sich weniger für ihn eignet, die Vortheile der höheren Temperatur aufhebt und ein gewöhnliches Wachsthum wie bei Zimmertemperatur in alkalischer Nährgelatine herbeiführt.

Die wesentlichsten Differenzen des Wachsthums beider Vibrionen in Plattenculturen ergeben sich aus dem oben Gesagten von selbst. Demnach ist es leicht verständlich, weshalb die bei beiden sich bildende Einsenkung bei Vibrio Proteus von grösserem Umfange und geringerer Tiefe ist als bei Vibrio Koch., weshalb bei ersterem der graue Punkt in der Mitte der Colonie, d. h. die Anhäufung der Mikrobien, fehlt, welcher bei Vibrio Koch. sich zeigt und weshalb schliesslich Vibrio Proteus in relativ kurzer Zeit entsprechend seiner vornehmlichen Ausdehnung nach der Fläche die Gelatine weithin verflüssigt hat, während Vibrio Koch. durch die ganze Dicke der Gelatine durchdringt, so dass der flüssige Inhalt der Colonie bald auf der Glasplatte selbst aufliegt ohne in so ausgedehntem Maase zu verflüssigen.

Um nun einen genauen Anhaltspunkt zu gewinnen für die Verschiedenheit der beiden Vibrionen eigenen, gelatineverflüssigenden Kraft, d. h. der Production eines peptonisirenden Fermentes, wurden die beiden mit den Vibrionen inficirten Gelatineröhrchen, welche bei obigem Versuch 41 Stunden lang bei 37 ° C.

aufbewahrt waren, jetzt 24 Stunden einer Temperatur von 5° C. ausgesetzt. Es zeigte sich folgender Unterschied:

Vibrio Koch:

An der Oberfläche ist eine ca. 4 mm dicke Schicht, ungefähr der stärkeren Anhäufung der Vibrionen entsprechend, flüssig geblieben. Darunter zeigt sich die Gelatine scharf abgeschnitten starr bis zum Grund in einer Höhe von ca. 8 cm. Zu beachten ist der starke Bodensatz.

Vibrio Proteus:

Es zeigt sich die ganze Gelatinesäule noch flüssig mit Ausnahme des klaren Theiles am Boden des Röhrchens in einer Höhe von vielleicht 8 mm.

Unter diesen Umständen tritt also ein Unterschied in der Production eines gelatinelösenden Fermentes bei beiden deutlich hervor. Es scheint die bereits früher häufig gemachte Beobachtung, dass die Bacterien hauptsächlich bei reichlicher Sauerstoffaufnahme ein Ferment abspalten und dass die Schwärmzustände der Spaltpilze deshalb auch die fermentativ wirksamsten sind, weil in diesem Zustand die Bacterien an die Oberfläche der Nährlösung dringen und reichlich Sauerstoff aufnehmen können, auch hier bestätigt zu werden. Bei Vibrio Koch. zeigt sich nur derjenige Theil der Gelatine vollständig peptonisirt, in welchem die Vibrionen noch zum Theil wenigstens deutlich Eigenbewegung aufweisen, während die in grosser Zahl als Bodensatz abgelagerten Vibrionen, offenbar ohne Eigenbewegung und deshalb auch nur mangelhaft mit Sauerstoff versehen auch keine gelatinelösende Wirkung erkennen lassen.

Bei Vibrio Proteus aber zeigt sich die ganze Gelatinesäule im Bereich der schwärmenden Microbien völlig verflüssigt, wogegen die nicht so direct ihrem Einfluss ausgesetzte unterste Schicht, deren ungetrübtes Aussehen und Mangel an Bodensatz das Vorhandensein grösserer Bacterienmengen ausschloss, noch erstarrte.

Um schliesslich einen Rückblick auf das Ganze zu werfen, so ergab sich zunächst, dass das von beiden Vibrionen gebildete,

peptonisirende Ferment eine sehr intensive Wirkung auf Leim und coagulirtes Eiweiss entfaltet und sich in chemisch-physiologischer Beziehung dem Trypsin des Pankreassaftes nähert; ferner, dass dasselbe auch abgetrennt von den producirenden Spaltpilzzellen seine Wirksamkeit äussert. Die Annahme der Production eines diastatischen Fermentes bei beiden Vibrionen wurde als nothwendiges Postulat hingestellt, ohne dass es aber gelungen wäre, den eigentlichen Nachweis hierfür zu erbringen. Sodann wurde gezeigt, dass die rothen Blutkörperchen der Einwirkung des peptonisirenden Fermentes einen ziemlich energischen Widerstand leisten, und dass dieselben Vibrionen ebensowenig wie die Typhusbacillen einen besonderen Blutgiftstoff abscheiden, dass vielmehr das Absterben der Blutkörperchen in der bezeichneten Salzlösung bei Gegenwart lebender Bacterien anderen Einflüssen, vielleicht in erster Linie dem Entziehen des Sauerstoffs durch die Bacterien zuzuschreiben ist. Endlich wurde constatirt, dass die nachgewiesene Differenz in der Eigenbewegung bei Vibrio Koch und Vibrio Proteus in flüssiger Gelatine hinreichend ist, die Unterschiede in ihrer Wachsthumsart in Platten- und Stichculturen zu erklären.

Zum Schluss sei es mir gestattet, Herrn Stabsarzt und Privatdocent Dr. H. Buchner für die Liebenswürdigkeit, mit welcher er mir erlaubte, in seinem Laboratorium zu arbeiten und für das freundliche Interesse, welches er meiner Arbeit hat zu Theil werden lassen, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.